

学校编码: 10384

学号: 200426076

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

装甲 RNA 病毒样颗粒的制备及  
其在荧光 PCR 检测禽流感病毒中的应用

Preparation of armored RNA virus-like particles and the  
Application of AIV detection by real-time PCR

奚 敏

指导教师姓名: 沈明山教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2007 年 4 月 28 日

论文答辩时间: 2007 年 8 月 4 日

学位授予日期: 2007 年 月

答辩委员会主席: 陶 涛 教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2007 年 8 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要	1
ABSTRACT	3
第一章 前 言	5
1.1 装甲 RNA (Armored RNA) 技术	6
1.2 实时荧光 PCR 技术	9
1.2.1 实时荧光 PCR 原理	10
1.2.2 实时荧光 PCR 检测方法	11
1.2.3 实时荧光 PCR 在临床检测上的应用	15
1.3 禽流感病毒的研究	16
1.3.1 禽流感病毒的形态结构与命名	16
1.3.2 禽流感病毒分子致病机理	17
1.3.3 禽流感的流行与灾害	18
1.3.4 禽流感的诊断技术	19
第二章 材料与方 法	21
2.1 实验材料	21
2.2 主要试剂	21
2.3 主要仪器	22
2.4 常用溶液的配制	22
2.5 引物和荧光探针的设计与合成	23
2.6 实验方法	24
2.6.1 中间载体 pET32a-CP 的构建	24
2.6.2 表达载体 pET32a-CP-IRES(简称 pCPES)的构建	28
2.6.3 病毒样颗粒 (VLPs) 的原核表达和双酶消化实验	31
2.6.4 病毒样颗粒的初步纯化和 RT-PCR 检测	32
2.6.5 病毒样颗粒(VLPs)的纯化及其形态观察和稳定性检测	34
2.6.6 荧光双链探针的熔解曲线	35
2.6.7 荧光双链探针的特异性实验	35
2.6.8 一步法反转录—实时荧光 PCR 检测病毒样颗粒 RNA 体系的优化	36
2.6.9 双色荧光 PCR 检测病毒样颗粒 RNA 和禽流感病毒	36
第三章 结果与分析	38
3.1 中间载体 pET32a-CP 的构建	38
3.2 表达载体 pET32a-CP-IRES(简称 pCPES) 的构建	39
3.3 病毒样颗粒的鉴定	40
3.3.1 表达产物的双酶消化鉴定	40
3.3.2 病毒样颗粒的 RT-PCR 结果	错误！未定义书签。
3.3.3 病毒样颗粒的电镜观察结果	41
3.3.4 病毒样颗粒的稳定性检测	43

3.4 不同比例荧光双链探针的熔解曲线 .....	43
3.5 荧光双链探针的特异性实验 .....	44
3.5.1 与靶序列的变温杂交反应 .....	44
3.5.2 实时荧光 PCR 检测 pCPES 和病毒样颗粒 RNA 反转录产物的实验 .....	44
3.6 一步法反转录-实时荧光 PCR 检测病毒样颗粒 RNA 体系的优化 .....	46
3.7 双色荧光 PCR 检测病毒样颗粒 RNA 和禽流感病毒实验 .....	51
第四章 讨论 .....	52
4.1 病毒样颗粒作为 RNA 病毒检测内标的研究 .....	53
4.2 检测病毒样颗粒 RNA 的实时荧光 PCR 体系 .....	55
4.3 双色荧光 PCR 检测内标和禽流感病毒体系 .....	57
4.4 本研究的意义 .....	57
小 结 .....	59
参考文献 .....	60
致 谢 .....	68

<b>Abstract(In Chinese)</b> .....	1
<b>Abstract(In English)</b> .....	3
<b>Chapter I Introdtion</b> .....	5
<b>1.1 Armored RNA technology</b> .....	6
<b>1.2 Real-time fluorescence PCR</b> .....	9
1.2.1 Principle of real-time fluorescence PCR .....	10
1.2.2 Detection methods of real-time fluorescence PCR.....	11
1.2.3 Clinic diagnosis using real-time fluorescence PCR .....	15
<b>1.3 Study of avian influenza virus</b> .....	16
1.3.1 Structure and naming of AIV.....	16
1.3.2 Molecular pathogenesis of AIV .....	17
1.3.3 Prevalence and disasters of AIV .....	18
1.3.4 Diagnosis of AIV .....	19
<b>Chapter II Materials and Methods</b> .....	21
<b>2.1 Materials</b> .....	21
<b>2.2 Reagents</b> .....	21
<b>2.3 Instruments</b> .....	22
<b>2.4 Solutions</b> .....	22
<b>2.5 Design and synthesis of primers and probes</b> .....	23
<b>2.6 Methods</b> .....	24
2.6.1 Construction of pET32a-CP .....	24
2.6.2 Construction of pET32a-CP-IRES(pCPES).....	28
2.6.3 Prokaryotic expression and enzyme digestion assay of virus-like particles .....	31
2.6.4 Initial purification of VLPs and RT-PCR test.....	32
2.6.5 Purification of VLPs and form observation and stability test.....	34
2.6.6 Melt curve of double-stranded fluorescence probes.....	35
2.6.7 Specificity test of double-stranded fluorescence probes .....	35
2.6.8 Optimization test of VLPs detection using one-step reverse transcript real-time fluorescence RT-PCR .....	36
2.6.9 Detection of VLPs and AIV using dual real-time PCR.....	36
<b>Chapter III Results</b> .....	38
<b>3.1 Identification of pET32a-CP</b> .....	38
<b>3.2 Identification of pET32a-CP-IRES(pCPES)</b> .....	39
<b>3.3 Identification of VLPs</b> .....	40
3.3.1 Identification of expression product in two enzyme digestion test .....	40
3.3.2 RT-PCR Result of VLPs .....	错误！未定义书签。
3.3.3 Result of VLPs observation using transmission electron microscope.....	41
3.3.4 Stability detection of VLPs .....	43
<b>3.4 Melt curve of different ratio of double-stranded fluorescence probes</b> .....	43
<b>3.5 Specificity test of double-stranded fluorescence probes</b> .....	44
3.5.1 Thermal denaturation curve .....	44
3.5.2 Detection test of pCPES and VLPs cDNA .....	44

3.6 Optimization test of VLPs RNA detection using one-step reverse transcript real-time fluorescence PCR .....	46
3.7 Detection of VLPs and AIV using dual real-time PCR.....	51
Chapter IV Discussion.....	52
4.1 Study of virus-like particles as internal control in RNA virus .....	53
4.2 VLPs RNA detection system in real-time fluorescence PCR assay.....	55
4.3 Detection system of internal control and AIV in dual real-time PCR assay ....	57
4.4 Significance of the study .....	57
Brief summary.....	59
References.....	60
Acknowledgment .....	59

## 摘 要

Armored RNA 技术是近几年发展起来的一种新的 RNA 质控品的制备技术。该技术的原理就是利用基因工程方法将包含有大肠杆菌 MS<sub>2</sub> 噬菌体的外壳蛋白基因的序列及外源片段克隆到表达载体中，这一载体能够将外源克隆片段转录成重组 RNA，并利用载体上 MS<sub>2</sub> 的外壳蛋白基因合成的外壳蛋白将其装配成球状 RNA 病毒结构的 RNA-蛋白质复合体，我们称之为 RNA 病毒样颗粒。目前 Armored RNA 技术正逐渐应用于 RNA 病毒的检测方面。

首先，根据 Armored RNA 技术的原理，构建了能表达耐核糖核酸酶病毒样颗粒的载体，选取口蹄疫病毒 IRES RNA 片断为内标检测基因，克隆到表达载体噬菌体基因的下游，最终得到能够表达病毒样颗粒的原核表达载体，转化大肠杆菌进行诱导表达。通过对表达产物的双酶消化实验进行初步确认。提取表达产物的 RNA 进行反转录 PCR，可以确定表达产物是含口蹄疫病毒 IRES RNA 的病毒样颗粒。蔗糖密度梯度离心纯化表达产物，透射电镜观察其形态。一系列的实验结果表明，本研究制备得到的病毒样颗粒为含口蹄疫病毒 IRES RNA，直径约为 26nm 的圆形颗粒。该病毒样颗粒具有耐核糖核酸酶的特性，稳定性良好，易保存。

其次，通过设计荧光双链探针对病毒样颗粒 RNA 进行一步法反转录实时荧光 PCR 检测。我们以 IRES 为检测靶序列，系统优化了检测病毒样颗粒 RNA 的反应体系和反应条件。结果表明，在最优的检测条件下，荧光双链探针可以在 2h 内通过一步法反转录荧光 PCR 检测出病毒样颗粒外壳蛋白包裹的 IRES RNA。

最后本研究通过优化反应体系，以病毒样颗粒为内标，对禽流感病毒进行实时荧光 PCR 检测。实验结果说明，实时荧光 PCR 可以迅速准确的检测禽流感病毒，同时由于内标的存在，也避免了在整个病毒检测过程中抑制因子的存在或者人为误差等因素造成的假阴性结果。

本研究制备的含有口蹄疫病毒 IRES RNA 的病毒样颗粒，通过对其进行的一系列鉴定实验和应用用于禽流感病毒检测的实验，可以看出该病毒样颗粒具有与

RNA 病毒相似的结构,即都是蛋白外壳包裹核酸的蛋白-RNA 复合体,所以可以把该病毒样颗粒与其它病毒一起经历核酸提取、反转录和 PCR 扩增检测,从而对 RNA 病毒的检测进行全程监控,避免了假阴性结果的出现。该病毒样颗粒具有耐核糖核酸酶的特性,并且稳定性好、易于储存、安全可靠。因此本研究所制备的病毒样颗粒为以后 RNA 病毒的检测提供了一个良好的平台。

关键词: Armored RNA 技术; 病毒样颗粒; 耐核糖核酸酶; 禽流感病毒



## ABSTRACT

Armored RNA technology is a new technique of preparation for RNA quality control, which is developed in recent years. The principle is that E.coli bacteriophage MS<sub>2</sub> coat protein gene and foreign fragment was cloned into the expression vector by genetic engineering methods, and the foreign fragment can be transcribed into recombinant RNA. The recombinant RNA is packaged by MS<sub>2</sub> coat protein as RNA-protein complex. This spherical RNA-protein complex was named as virus-like particles. Now Armored RNA technology is gradually applied to the research of detection of RNA viruses.

Firstly, according to the principle of Armored RNA technology, a vector that can express RNase-resistant virus-like particles was constructed. The Foot-and-mouth disease virus IRES RNA fragment was selected as the internal standard gene. The gene was cloned into the expression vector, then the prokaryotic expression vector expressing virus-like particles was obtained and was induced. The expression products was confirmed by the enzyme digestion assay. The virus-like particles RNA was extracted and was identified by RT-PCR. Then we confirmed that the expression products were virus-like particles containing foot-and-mouth disease virus IRES RNA. The expression products were purified by sucrose density gradient centrifugation and were observed by transmission electron microscope. A series of experimental results showed that the expression products were circular virus-like particles containing foot-and-mouth disease virus IRES RNA. The diameter of the virus-like particles is about 26nm. The prepared virus-like particles with good stability are easy to preserve because of the RNase - resistant characteristic.

Secondly, the IRES gene was selected as the target, and we tested the virus-like particles RNA by double-stranded fluorescent probes in one-step reverse transcript real-time fluorescence PCR assay. Then we optimized the reaction systems and the reaction conditions. The results showed that double-stranded fluorescent probes could test the virus-like particles IRES RNA in the optimal one-step reverse transcript real-time fluorescence PCR assay.

Finally, the prepared virus-like particles was selected as internal control, and avian influenza virus was tested through adjusting the reaction system in real-time fluorescence PCR assay. The experiment results showed that avian influenza virus could be quickly tested by real-time PCR. And because of the internal control, we can also avoid the false negative results caused by inhibitors and human error in the assay or other factors.

The virus-like particles containing foot-and-mouth disease virus IRES RNA prepared in the study were tested by a series of experiments and applied to the detection assay of avian influenza virus. From these experiments, we can know that the structure of the virus-like particles is similar as RNA virus. Both of them are RNA-protein complexes with RNA wrapped by coat proteins. So we can put the virus-like particles together with other virus, then they experience RNA extraction, reverse transcription PCR amplification and detection in order to monitor the whole process and avoid false negative results. The virus-like particles with RNase - resistant characteristics have good stability. They are also secure and easy to store. Therefore, The virus-like particles prepared in the study provide a good platform for the detection of RNA viruses.

**Key words:** Armored RNA technology; virus-like particles;

RNase – resistant; avian influenza virus

## 第一章 前言

RNA 病毒是以 RNA 为遗传物质的病毒总称。常见的 RNA 病毒有禽流感病毒 (AIV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、人类免疫缺陷病毒 (HIV) 以及严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV) 等, 这些 RNA 病毒危害性较强, 对人类的造成了严重的威胁。其中禽流感病毒在 1997 年首次出现感染人致死事件, 自此禽流感病毒越来越多的被人们所关注。禽流感 (avian influenza, AI) 是禽流行性感冒的简称, 是由 A 型流感病毒所引起的禽类全身或呼吸系统传染性疾病, 又称真性鸡瘟或欧洲鸡瘟<sup>[1-4]</sup>。禽流感最早是由 Perroncito 记述 1878 年发生在意大利鸡群的一种严重的疾病。1901 年, Centannic 和 Sarunozzi 分离和描述了该病的病原。但直到 1955 年, Sehafer 才证实鸡瘟病毒实际上是 A 型流感病毒。大量的历史资料和研究资料表明, 高致病性禽流感是一种毁灭性疾病, 几乎所有的家禽和野生鸟类都可感染此病。禽类感染禽流感病毒后, 可引起从亚临床到轻度上呼吸道疾病, 精神萎顿, 食欲减退, 种鸡产蛋量和孵化率下降, 到急性高度致死性疾病综合症, 造成巨大的经济损失。随着集约化养禽业的发展, 禽流感对养禽业威胁更大<sup>[5]</sup>。目前高致病性禽流感已被我国《家畜家禽防疫条例》和国际兽医局动物流行病组织 (IOE) 规定为 A 类烈性传染病<sup>[6,7]</sup>。自 1997 年香港禽流感事件至今, 已有多起高致病性禽流感疫情暴发, 而且在亚洲部分国家出现人感染高致病性禽流感病例并导致死亡, 对人类健康构成极大的潜在威胁, 加之禽流感病毒抗原及致病力的易变性, 使得世界范围内的人们都高度重视禽流感<sup>[8,9]</sup>。

由于禽流感病毒具有严重的危害性, 所以其快速准确的检测就显得至关重要。检测禽流感病毒常用的方法有传统的病毒分离试验、血凝抑制试验、病毒中和试验和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等, 以及分子生物学检测技术如核酸依赖的扩增技术 (NASBA)、常规 RT-PCR、实时 RT-PCR 技术和 PCR-ELISA 技术等。其中实时荧光 PCR 是近几年发展起来的新检测技术, 具有分析灵敏度高和简便快捷等方面的优点, 在病毒快速诊断中优势明显<sup>[10,11]</sup>。同时禽流感作为一种 RNA 病毒在 PCR 基础上的定性和定量检测中, 影响因素较多, 如实验人员测定操作中的随机

误差、扩增仪孔间温度的差异、标本核酸提取后抑制物的残留、待扩增靶核酸的浓度和逆转录的效率及试剂的问题等，这些因素均可能会影响 PCR 扩增的效率，进而造成结果的偏差，甚至假阴性的结果，所以 RNA 病毒的 PCR 测定必须使用质控品和标准品，才能保证结果的可靠性。传统的 RNA 病毒扩增检测的质控品和标准品有两种：一种为裸露的 RNA 或者原病毒颗粒，另一种为体外转录 cDNA。前者容易被广泛存在的核糖核酸酶降解且具有传染性，后者不能反应样品提取和逆转录过程对测定的影响。近几年，Pasloske 等人提出了一种新的 RNA 质控品制备技术，即装甲 RNA (Armored RNA) 技术<sup>[12,13]</sup>。装甲 RNA 技术是指由 MS<sub>2</sub> 噬菌体外壳蛋白包裹重组 RNA 的技术。目前 Armored RNA 技术正逐渐应用于 RNA 病毒的检测等方面<sup>[14-18]</sup>。综上所述要准确迅速的检测禽流感病毒，充分了解禽流感病毒的情况和检测方法是至关重要的。以下我们将从 Armored RNA 技术、实时荧光 PCR 方法及禽流感病毒三个方面进行详细介绍。

### 1.1 装甲 RNA (Armored RNA) 技术

近年来，由于 RNA 定量检测技术如反转录 PCR、核酸依赖的序列扩增 (NASBA)<sup>[19,20]</sup>、分枝链 DNA<sup>[21]</sup>、转录调控扩增<sup>[22]</sup>等技术的发展，这些技术已经被广泛应用于 RNA 病毒的检测。在 RNA 病毒的检测过程中还需要一个可靠的 RNA 质控品来判断检测结果是否可信。RNA 质控品包括定量的阳性质控品(外标)和防止假阴性的抑制质控品(内标)。其中抑制质控品(内标)是直接加到待测标本中，同时提取和检测以确保检测标本时是否出现抑制或者假阴性。内标又分为竞争性内标和非竞争性内标。竞争性内标是指内标与待测基因具有相同的引物序列和不同的探针检测区的片段，二者一起竞争引物，因而能够真实的检测到待测基因中是否存在抑制。非竞争性内标是指内标与待测基因具有不同的引物序列和不同的探针检测序列，因而非竞争性内标与待测目的基因之间不存在引物竞争关系。最初 RNA 质控品的制备主要是通过合成相应的 DNA 模板，然后经体外转录方法合成<sup>[23-25]</sup>。这种方法制备的 RNA 质控品有两个缺点：一是稳定性差，由于 RNA 片断在合成、纯化及其储存的过程中极易受到 RNA 酶影响而被降解，这极

大的影响了 RNA 定量的可靠性与准确性。人们为了提高 RNA 的稳定性, 尝试了进行各种化学修饰方法, 但是这种方法成本过高, 并且实际运用的效果也并不理想。二是裸露的 RNA 片断与病毒本身具有的蛋白包裹核酸的结构有很大不同, 它不能够反映出病毒 RNA 提取和逆转录对检测的影响。为了解决这一问题, 人们直接利用病毒本身作为质控品<sup>[26,27]</sup>, 但是由于原病毒颗粒具有传染性, 所以这种方法存在生物安全性的问题。

1997 年 Pasloske<sup>[12,13]</sup> 等人提出了一种新的 RNA 质控品制备技术, 即装甲 RNA(Armored RNA)技术解决了以上传统 RNA 质控品存在的问题。Armored RNA 技术的原理<sup>[28-30]</sup>是将包含有大肠杆菌 MS<sub>2</sub> 噬菌体的外壳蛋白基因的序列及外源片段克隆到表达载体中。这一载体能够将外源克隆片段转录成 RNA, 并利用载体上 MS<sub>2</sub> 的外壳蛋白基因合成的外壳蛋白将其装配成球状 RNA 病毒结构的 RNA-蛋白质复合物, 我们称之为装甲 RNA 病毒样颗粒。

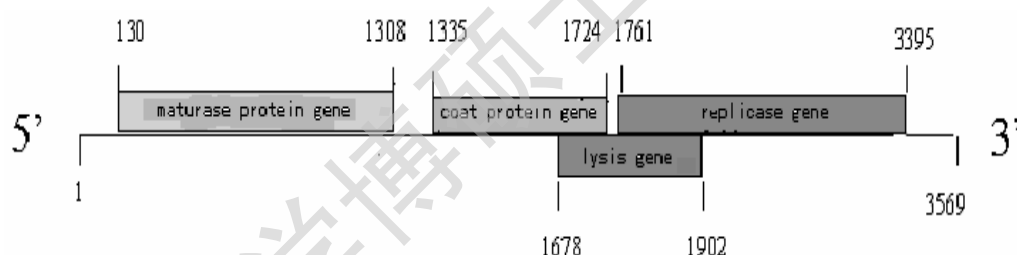


图 1-1 大肠杆菌 MS<sub>2</sub> 噬菌体基因组<sup>[25]</sup>

Fig 1-1 E. coli MS<sub>2</sub> bacteriophage genome

大肠杆菌 MS<sub>2</sub> 噬菌体属于正极性单链 RNA 球形病毒, 基因组全长 3659bp, 编码成熟酶蛋白(或 A 蛋白)、外壳蛋白、复制酶蛋白和裂解蛋白等 4 种蛋白质分子(如图 1-1)。每个 MS<sub>2</sub> 噬菌体是含有 180 个拷贝的外壳蛋白, 一拷贝的成熟蛋白, 包裹一分子 RNA 的正二十面体<sup>[31]</sup>。在早期噬菌体的研究中发现, 噬菌体复制酶基因的 5'端有一个约 21 个核苷酸组成的茎-环区域(操纵子或 pac 位点), 噬菌体外壳蛋白的二聚体与这个茎环结构的结合不但引发了外壳蛋白本身的组装, 而且还引发了外壳蛋白包裹整个噬菌体基因组 RNA 的过程<sup>[32,33]</sup>。MS<sub>2</sub> 噬菌体成熟酶

蛋白可与噬菌体 RNA 的两个位点发生作用。这种相互作用不是噬菌体包装过程所必须的,但是在噬菌体颗粒中这种相互作用可以用来保护基因组 RNA 不被广泛存在的核糖核酸酶消化<sup>[34]</sup>。研究表明 MS<sub>2</sub> 噬菌体成熟酶蛋白对噬菌体外壳的包装起重要作用<sup>[35]</sup>。裂解蛋白和复制酶蛋白不是噬菌体颗粒的组成部分。裂解蛋白的作用是裂解大肠杆菌细胞从而释放出病毒颗粒。复制酶蛋白的作用是与其它 3 个大肠杆菌宿主蛋白组成一个蛋白复合体,这个蛋白复合体负责基因组 RNA 的复制和合成。研究发现将 MS<sub>2</sub> 噬菌体的成熟酶蛋白和外壳蛋白的基因以及包含基因调节元件的 5'非编码序列的基因克隆到表达载体中,经过诱导表达得到成熟酶蛋白和外壳蛋白,并且在成熟酶以及噬菌体基因组 RNA 片段的协同作用下,外壳蛋白可组装为成熟的病毒样颗粒,并具备耐 RNase 作用的特性<sup>[28]</sup>。如果将 MS<sub>2</sub> 噬菌体的成熟酶蛋白、外壳蛋白的基因以及包含基因调节元件的 5'非编码序列的基因和外源片断一起克隆到表达载体中,载体可以将噬菌体基因和外源基因转录成重组 RNA,同时外壳蛋白进行包装,得到可以包裹重组 RNA 的病毒样颗粒<sup>[30]</sup>。Armored RNA 包装体系如图 1-2 所示:

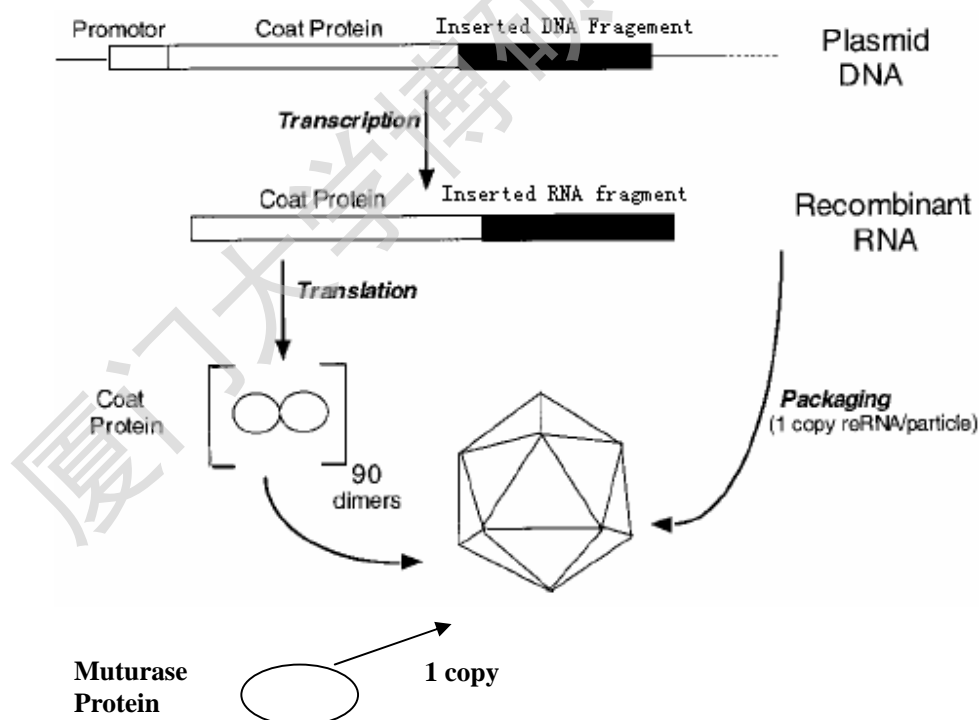


图1-2 装甲RNA的包装体系示意图

Figure 1-2 The demonstration of Armored RNA packaging system<sup>[13]</sup>

Armored RNA 技术采用基因工程方法表达的蛋白-RNA 复合体作为 RNA 病毒检测的内标具有以下优点：首先，这种蛋白-RNA 复合体的结构与 RNA 病毒相似，即都是蛋白外壳包裹核酸，因此可以把内标与病毒材料放在一起，共同经历核酸提取、反转录和 PCR 扩增，从而对 RNA 病毒的检测进行全程监控，避免出现假阴性结果。其次，Armored RNA 技术得到的病毒样颗粒无传染性，不会对实验人员造成伤害，因此生物安全性较好。最后，由于这种病毒样颗粒具有耐核糖核酸酶的特性，所以作为 RNA 病毒检测的内标稳定性良好，并且易于保存。

## 1.2 实时荧光 PCR 技术

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术是 1985 年问世的一项基因检测技术。它可对特定基因进行扩增，并且具有简便易行、灵敏度高等优点，因此 PCR 在早期被广泛应用于获取特定基因或基因片段及临床基因诊断等领域<sup>[36]</sup>。但是，传统 PCR 技术不能准确定量，且操作过程中易污染而容易造成假阳性结果<sup>[37-39]</sup>。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) 技术发明至今已 20 余年了，在这期间该技术得到了不断的发展，比如杂交法、竞争法、酶联法及尿苷酶降解法等，但均不很成功，直到实时荧光 PCR 技术出现后上述问题才得到较好的解决。实时荧光定量 PCR(Real-time fluorescent quantitative PCR, FQ-PCR) 是在 PCR 技术基础上发展起来的一种高度灵敏的核酸定量技术，1996 年由美国 Applied Biosystems 公司首先推出。它是在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。实时荧光 PCR 是用产生荧光信号的指示剂显示扩增产物的量<sup>[40-44]</sup>。实时荧光 PCR 进行实时动态连续的荧光监测，消除了标本和产物的污染，且无复杂的产物后续处理过程。实时荧光 PCR 的荧光信号是通过荧光染料嵌入双链 DNA，或双重标记的序列特异性荧光探针或能量信号转移探针等方法获得，大大提高了检测的灵敏度、特异性和精确性。与传统的 PCR 相比，实时荧光 PCR 更加快速、灵敏，并能有效地减少实验过程中产生污染的危险。目前实时荧光 PCR 已经广泛应用于分子生物学研究和医学研究等领域。

### 1.2.1 实时荧光 PCR 原理

实时荧光 PCR 技术,是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。在 real-time 技术的发展过程中,两个重要的发现起着关键的作用<sup>[45]</sup>: (1) 在 90 年代早期, Taq DNA 多聚酶的 5'核酸外切酶活性的发现,它能降解特异性荧光标记探针,因此使得间接的检测 PCR 产物成为可能。(2)此后荧光双标记探针的运用使在一密闭的反应管中能实时地监测反应全过程。这两个发现的结合以及相应的仪器和试剂的商品化发展导致实时荧光 PCR 方法在研究工作中的运用。

PCR 反应过程中产生的 DNA 拷贝数是呈指数方式增加的,随着反应循环数的增加,最终 PCR 反应不再以指数方式生成模板,从而进入平台期。在传统的 PCR 中,常用凝胶电泳分离并用荧光染色来检测 PCR 反应的最终扩增产物,因此用此终点法对 PCR 产物定量存在不可靠之处。在实时荧光 PCR 中,对整个 PCR 反应扩增过程进行了实时的监测和连续地分析扩增相关的荧光信号,随着反应时间的进行,监测到的荧光信号的变化可以绘制成一条曲线。在 PCR 反应早期,产生荧光的水平不能与背景明显地区别,而后荧光的产生进入指数期、线性期和最终的平台期,因此可以在 PCR 反应处于指数期的某一点上来检测 PCR 产物的量,并且由此来推断模板最初的含量<sup>[40]</sup>。为了便于对所检测样本进行比较,在实时荧光 PCR 反应的指数期,首先需设定一个荧光信号的域值,一般这个域值(threshold)是以 PCR 反应的 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号(baseline),荧光域值的缺省设置 3~15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍。如果检测到的荧光信号超过域值被认为是真正的信号,它可用于定义样本的域值循环数(Ct)。Ct 值的含义是:每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数。研究表明,每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系,起始拷贝数越多, Ct 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线,因此只要获得未知样品的 Ct 值,即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库